

# 水产品中副溶血性弧菌 LAMP 检测方法的优化

胡元庆<sup>1,2</sup>, 黄玉萍<sup>1</sup>, 李凤霞<sup>1</sup>, 郑艺梅<sup>1</sup>, 张丹凤<sup>1</sup>

(1. 闽南师范大学生物科学与技术学院, 福建漳州 363000)

(2. 扬州大学江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏扬州 225000)

**摘要:** 本文用副溶血性弧菌不耐热溶血素 (*tlh*) 基因作靶标, 优化环介导等温扩增技术检测水产品副溶血性弧菌的方法。体系用 Bst DNA 聚合酶催化, 恒温反应 60 min, 产物分别用 2% 琼脂糖凝胶电泳和 SYBR Green I 染色鉴定, 对各项反应参数进行优化; 将新鲜菌液作 10 倍梯度稀释后进行 LAMP 和 PCR 反应, 比较二者的敏感度; 对 32 株食源性病原菌 (包括分离于水产品的 25 株副溶血弧菌, 1 株副溶血性弧菌 ATCC17802 标准株, 大肠杆菌 D5、金黄色葡萄球菌 CMCC26003、志贺氏菌 B4、蜡样芽胞杆菌 63302、单核细胞增生李斯特菌 54001 和沙门氏菌 50041 各 1 株) 进行 LAMP 扩增, 验证其特异性; 虾样品用菌液进行模拟污染, 分析 LAMP 的可靠性。各参数最佳条件为:  $Mg^{2+}$  浓度为 3.6 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.96 mmol/L, Bst DNA 聚合酶用量为 4.8 U, 内外引物浓度比为 8:1, 最佳反应温度为 63 °C, 时间为 60 min; LAMP 的检测限为 1 CFU/mL, 低于 PCR 方法的最低检测限; 特异性试验检测 26 株副溶血性弧菌均为阳性, 6 株非副溶血性弧菌为阴性; 人工污染试验中检测限达 1 CFU/mL, 无假阳性。建立的 LAMP 方法操作简单且灵敏度高, 适用于水产食品中副溶血弧菌的现场快速检测。

**关键词:** 环介导等温扩增技术; 副溶血性弧菌; *tlh* 基因

文章编号: 1673-9078(2017)6-313-320

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.046

## Optimization of Loop-Mediated Isothermal Amplification Methods for the Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Aquatic Products

HU Yuan-qing<sup>1,2</sup>, HUANG Yu-ping<sup>1</sup>, LI Feng-xia<sup>1</sup>, ZHENG Yi-mei<sup>1</sup>, ZHANG Dan-feng<sup>1</sup>

(1. School of Biological Science and Biotechnology, Minnan Normal University, Zhangzhou 363000, China)

(2. Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225000, China)

**Abstract:** The heat-sensitive hemolysin (*tlh*) gene was used as the target in this study, and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) conditions were optimized to develop a method for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products. The LAMP reaction system was catalyzed using Bst DNA polymerase and the reaction proceeded at a constant temperature for 60 min. The amplified products were identified by 2% agarose gel electrophoresis and SYBR Green I staining, and all reaction parameters were optimized. LAMP and polymerase chain reaction (PCR) amplification were performed after ten-fold serial dilution of the fresh bacterial culture, and the sensitivities of the two methods were compared. LAMP was performed on 32 foodborne pathogens (including 25 strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from aquatic products, *Vibrio parahaemolyticus* strain ATCC 17802, *Escherichia coli* strain D5, *Staphylococcus aureus* strain CMCC26003, *Shigella boydii* strain B4, *Bacillus cereus* strain 63302, *Listeria monocytogenes* strain 54001, and *Salmonella* Enteritidis strain 50041), and the specificity of LAMP was verified. The reliability of LAMP was evaluated by measuring shrimp samples contaminated with *V. parahaemolyticus* culture. The optimum conditions were as follows: 3.6 mmol/L magnesium ion, 0.96 mmol/L dNTPs, 4.8 U Bst DNA polymerase, 8:1 ratio of inner and outer primers, reaction temperature of 63 °C, and reaction time of 60 min. The detection limit of the LAMP assay was 1 CFU/mL, which was lower than that of the PCR method ( $1 \times 10^5$  CFU/mL). In specificity tests, all 26 strains of *V. parahaemolyticus* were positive, and the other six strains were negative. In the detection of artificially contaminated samples, the detection limits were 1 CFU/mL and there were no false positive results. In conclusion, the established LAMP assay is a simple, rapid, specific, and sensitive detection method that is suitable for the rapid on-site detection of *V. parahaemolyticus* in aquatic products.

**Key words:** loop-mediated isothermal amplification; *Vibrio parahaemolyticus*; *tlh* gene

收稿日期: 2016-04-29

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目 (2017J01453); 福建省教育厅 A 类项目 (JA14203); 漳州市自然科学基金项目 (ZZ2014J20); 江苏人兽共患病学重点实验室开放课题 (R1402); 国家海洋局第三研究所开放课题 (HY201503); 国家级大学生创新训练项目 (201610402012)

作者简介: 胡元庆 (1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食源性微生物控制, 食品安全检测技术

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, Vp) 是一种常见的食源性病原菌, 主要污染贝类海产品, 其中零售市场中贝类和甲壳类污染尤为突出<sup>[1]</sup>。人食用被该菌接触且未彻底加工或生熟交叉污染的食物可引起较严重的中毒事件, 主要表现为急性发作、腹痛、呕吐、腹泻及水样便<sup>[2]</sup>。在我国, 由副溶血性弧菌引起的食物中毒占微生物性食物中毒首位, 特别是水产品消费量较大的沿海省份<sup>[3]</sup>。控制水产品中副溶血性弧菌污染问题的关键是快速检测样品。传统微生物培养法是检测的“金标准”, 但其耗时长达 4~7 d, 且工作量很大, 难以满足快速检测的需求。目前, PCR<sup>[4]</sup>、实时荧光 PCR<sup>[5]</sup>和 ELISA<sup>[6]</sup>等技术已在副溶血性弧菌检测中得到广泛的开发应用, 但其需要专门的检测设备, 在基层和现场检测中很难实现。

环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是一种新型的核酸扩增方法, 选择特异性检测靶标, 是建立准确高效 LAMP 方法的关键技术问题。近年来, 国内外学者针对副溶血性弧菌的 *tlh*、*tdh*、*gyrB* 基因建立了 LAMP 检测食品中污染菌的方法<sup>[7]</sup>。所有副溶血性弧菌分离株都含有不耐热溶血毒素 (TLH), 这种溶血素是副溶血性弧菌所特有的, 因此它的编码基因 *tlh* 常被用作检测副溶血性弧菌的靶基因。

与其他毒力基因不同, *tlh* 基因作为检测靶点, 更适合食品及环境中污染性副溶血性弧菌的检测分析, 非致病性细菌的存在不会被忽略。2007 年, 徐芊等<sup>[8]</sup>在国内首次建立了检测副溶血性弧菌 *tlh* 基因的 LAMP 方法, 并就其特异性和灵敏度与普通 PCR 作对比, 结果显示 LAMP 的特异性和灵敏度均高于普通 PCR 反应。纪懿芳<sup>[9]</sup>和秦国民<sup>[10]</sup>在不同的实验室均以 *tlh* 基因为靶点建立了用于检测副溶血性弧菌的 LAMP 方法, 但其条件参数并不统一。本研究在以上实验的基础上, 进一步优化水产品中 LAMP 检测副溶血性弧菌的最佳条件参数, 为 LAMP 试剂盒标准化提供依据。

本试验是以副溶血性弧菌 *tlh* 基因为靶基因设计 4 条特异性引物, 通过对反应体系和反应条件的优化, 建立检测副溶血性弧菌的 LAMP 方法, 用于现场和基层实验室检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

实验所用菌株如表 1 所示。

表 1 实验所用菌株

Table 1 Strains used in the experiments

菌株	来源
副溶血性弧菌 ATCC17802	福建省漳州市出入境检验检疫局
副溶血性弧菌 Vp-WG15 1-8	实验室分离 (文蛤)
副溶血性弧菌 Vp-HG15 1-8	实验室分离 (花蛤)
副溶血性弧菌 Vp-C15 1-9	实验室分离 (蛏)
大肠杆菌 D5	福建省漳州市出入境检验检疫局
金黄色葡萄球菌 CMCC26003	福建省漳州市出入境检验检疫局
志贺氏菌 B4	福建省漳州市出入境检验检疫局
蜡样芽胞杆菌 63302	福建省漳州市出入境检验检疫局
单核细胞增生李斯特菌 54001	福建省漳州市出入境检验检疫局
沙门氏菌 50041	福建省漳州市出入境检验检疫局

#### 1.1.2 主要试剂与培养基

Bst DNA 聚合酶大片段和 10×反应缓冲液购自上海易色医疗科技有限公司; dNTP Mixture 购自上海诺伦生物医药技术有限公司; 2×Power Taq PCR MasterMix 购自北京百泰克生物技术有限公司; 100 bp DNA ladder 购自上海捷瑞生物工程有限公司; SYBR Green I 购自上海捷瑞生物工程有限公司; 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 购自西陇化工股份有限公司; TCBS 培养基、3%氯化钠碱性蛋白胨水、LB 培养基购自北京陆桥技术股份有限公司;

营养琼脂购自杭州百思生物技术有限公司。

### 1.2 主要仪器

HQY-C 恒温振荡摇床 (江苏省金坛市鸿科仪器厂); HH-2 数显恒温水浴锅 (江苏省金坛市科析仪器有限公司); GSP-9050MBE 隔水式恒温培养箱 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 手提式压力蒸汽灭菌器 (上海博迅实业有限公司生); SW-CJ-1FD 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); Tprofessional Thermocycler 型 PCR 仪 (德国 Biometra

公司); RED 个人型凝胶成像系统(美国 ProteinSimple 公司); DYCP-31CN 型电泳仪(北京市六一仪器厂); MIKRO 220R 冷冻离心机(德国 Hettich 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 细菌的培养

将副溶血弧菌接种到 TCBS 固体培养基上, 对照菌接种到普通营养琼脂上, 37 °C 培养 18~24 h; 挑取副溶血弧菌单菌落接种于 3% 氯化钠碱性蛋白胨水中, 对照菌单菌落接种于 LB 培养基中, 37 °C, 200 r/min 震荡培养 18~24 h。

#### 1.3.2 DNA 模板的制备

取 1 mL 菌悬液于 1.5 mL 离心管中, 16000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。菌体沉淀用 1 mL 无菌去离

子水洗两次(16000 r/min, 离心 5 min)后, 取 100 μL 无菌去离子水使菌体沉淀悬浮其中, 于 100 °C 中煮沸 10 min, 迅速置于冰上冷却, 16000 r/min 离心 5 min, 取上清液 100 μL 作为 DNA 模板, -20 °C 保存备用。

#### 1.3.3 引物设计与合成

选择副溶血性弧菌 *tlh* 基因作为靶基因。根据副溶血性弧菌 *tlh* 基因的保守区域(GenBank 登陆号为 AY578148)<sup>[11]</sup>, 利用 Primer Explorer V4 软件在线(<http://primerexplore-r.jp/e/>)设计 LAMP 的一套引物, 包括外引物 F3 和 B3, 内引物 FIP 和 BIP。为了更好的突出 LAMP 的优势, 设计 1 对引物用于 PCR 反应。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。引物序列见表 2。

表 2 *tlh* 基因引物序列

Table 2 Primer sequences of the *tlh* gene

方法	引物	引物序列(5'-3')
LAMP	<i>tlh</i> -F3	GGCACAAGCGATGTACTACA
LAMP	<i>tlh</i> -B3	GACGCTGCACACTCAGAG
LAMP	<i>tlh</i> -FIP	GCGCAGAAGTTAGCGTCTCGA AGCGCA AGGTTACAACATCAC
LAMP	<i>tlh</i> -BIP	GGTTTCGTGAACGCGAGCGACGCA ATGCGTGGGTGTAC
PCR	<i>tlh</i> -F	AA GCGGATTATGCAGAAGCACTG
PCR	<i>tlh</i> -R	GCTACTTTCTAGCATTTCCTCTGC

#### 1.3.4 LAMP 体系的建立

配制 25 μL 的反应体系, 依次加入 10×反应缓冲液 2.5 μL, 50 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 2.4 μL, 40 mmol/L dNTPs 0.9 μL, 10 μmol/L F3 和 B3 各 0.5 μL, 10 μmol/L FIP 和 BIP 各 4 μL, DNA 模板 1 μL, 8 U/μL Bst DNA 聚合酶 1 μL, 加无菌去离子水至 25 μL, 混匀。在 63 °C 水浴锅中反应 60 min, 然后 80 °C 酶灭活 10 min 结束反应。

#### 1.3.5 LAMP 产物的检测

对产物采用琼脂糖电泳和染料可视观察两种方法分析。电泳检测: 取 10 μL 反应产物与 2 μL 6×Loading Buffer 混匀于 2% 琼脂糖凝胶上电泳 45 min

(电压为 100 V), 电泳结果通过凝胶成像系统进行观察。若电泳图片上有阶梯状条带产生, 则结果为阳性; 反之则为阴性。染料检测: 在 25 μL 反应液中加入 1000×SYBR Green I 1~2 μL, 观察反应液的颜色变化。根据试剂说明书, 若反应液颜色变为绿色, 则结果为阳性; 若反应液颜色为橘黄或无色, 则结果为阴性。

#### 1.3.6 LAMP 体系的优化

分别对 Mg<sup>2+</sup>浓度、dNTPs 浓度、Bst DNA 聚合酶量、内外引物浓度比、反应时间和反应温度进行优化, 具体设计见表 3。对某一条件优化时, 其他参数按照 1.3.4 建立的体系进行。

表 3 LAMP 体系中参数优化的试验设计

Table 3 Design of parameter optimization in LAMP system

优化参数	试验设计条件
Mg <sup>2+</sup> 浓度/(mmol/L)	1.2、2.4、3.6、4.8、6.0、7.2
dNTPs 浓度/(mmol/L)	0.64、0.8、0.96、1.12、1.28、1.44、1.6、1.76
Bst DNA 酶量/U	0、1.6、3.2、4.8、6.4、8
内外引物比	4:1、6:1、8:1、10:1、12:1
反应时间/min	20、30、40、50、60、70
反应温度/°C	57、59、61、63、65、67



### 1.3.7 灵敏度的检测

将副溶血性弧菌标准株 ATCC 17802 用 1.3.1 的方法培养增菌, 利用分光光度法 ( $OD_{600}$ ) 调整菌悬液浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL, 并进行 10 倍梯度稀释, 菌悬液终浓度为 1 CFU/mL, 然后用 1.3.2 的方法制备不同稀释度细菌的基因组 DNA。分别取 1  $\mu$ L DNA 模板加入 1.3.6 已优化的反应体系进行 LAMP 扩增, 观察结果, 并与普通 PCR 作对比, 得出其灵敏度。PCR 25  $\mu$ L 反应体系: 2 $\times$ Power Taq PCR MasterMix 12.5  $\mu$ L, 上下引物各 1  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, 无菌去离子水 9.5  $\mu$ L, 混匀。PCR 反应循环条件: 预变性 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 40 次, 最后 72  $^{\circ}$ C 扩增 10 min。

### 1.3.8 特异性的检测

将 25 株实验室分离的副溶血性弧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌、蜡样芽胞杆菌、单核细胞增生李斯特菌、志贺氏菌用 1.3.1 和 1.3.2 的方法培养细菌和制备细菌基因组 DNA, 然后分别取 1  $\mu$ L DNA 模板加入 1.3.6 已优化的反应体系进行检测, 分析其特异性。

### 1.3.9 人工污染样品检测

取 1.3.7 中  $1 \times 10^3$  CFU/mL~1 CFU/mL 的菌液 1 mL 分别均匀涂在样品 (虾) 表面, 室温放置 4 h 后, 用 1 mL 无菌去离子水收回菌液, 用 1.3.2 的方法和煮沸不离心方法制备细菌的基因组 DNA。各取 1  $\mu$ L DNA 模板加入 1.3.6 已优化的反应体系进行 LAMP 扩增, 观察结果, 得出其人工污染样品的检测限。

## 2 结果与分析

### 2.1 LAMP 体系的建立

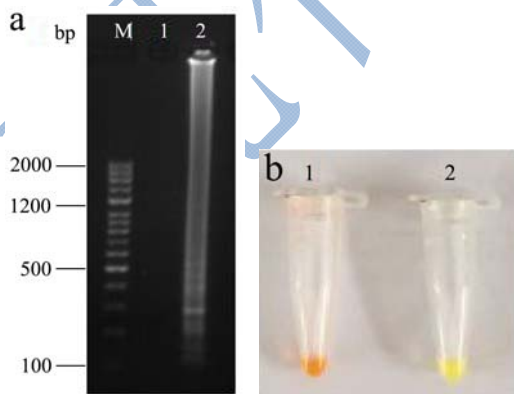


图 1 副溶血性弧菌 ATCC17802 LAMP 扩增结果

Fig.1 LAMP results for *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802

注: a 表示副溶血性弧菌 LAMP 电泳检测结果; b 表示副溶血性弧菌 LAMP SYBR Green I 检测结果。M 表示 100 bp

marker; 1 表示阴性对照; 2 表示副溶血性弧菌 ATCC17802。

本试验用副溶血性弧菌 *tth* 基因的特异性引物进行 LAMP 扩增。反应产物的电泳检测结果如图 1a 所示, 副溶血性弧菌 DNA 扩增出阶梯状片段, 阴性对照未扩增出片段。结果如图 1b 所示, 阳性管反应液变绿, 阴性对照管为橘黄。结果表明, 此 LAMP 体系能够对副溶血性弧菌 *tth* 基因进行正确扩增。

### 2.2 $Mg^{2+}$ 浓度的确定

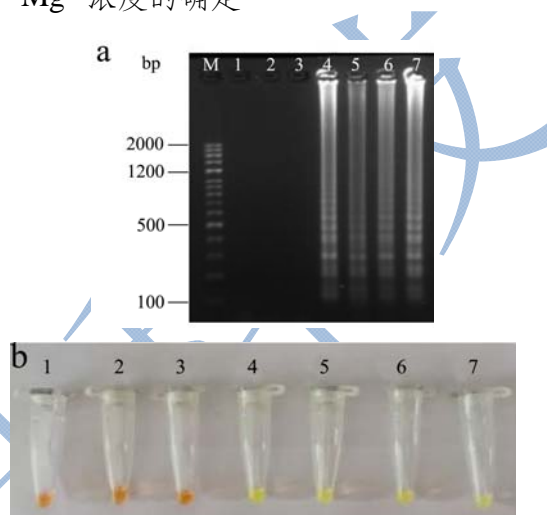


图 2  $Mg^{2+}$  浓度对 LAMP 反应的影响

Fig.2 Effect of magnesium ion ( $Mg^{2+}$ ) concentration on LAMP reaction

注: a 表示  $Mg^{2+}$  浓度对 LAMP 反应影响的电泳检测结果; b 表示  $Mg^{2+}$  浓度对 LAMP 反应影响的 SYBR Green I 检测结果。M 表示 100 bp marker; 1 表示阴性对照; 2~7 表示  $Mg^{2+}$  浓度依次为 1.2 mmol/L、2.4 mmol/L、3.6 mmol/L、4.8 mmol/L、6.0 mmol/L 和 7.2 mmol/L。

本试验对 LAMP 反应的  $Mg^{2+}$  浓度进行了优化, 如图 2a 所示, 当  $Mg^{2+}$  浓度为 1.2 mmol/L 和 2.4 mmol/L 时没有阶梯状片段产生; 当浓度到为 3.6 mmol/L、4.8 mmol/L、6.0 mmol/L 和 7.2 mmol/L 时产生阶梯状片段, 且在 3.6 mmol/L 时电泳条带的清晰度和亮度最佳。SYBR Green I 检测结果如图 2b 所示, 阴性对照管和  $Mg^{2+}$  浓度为 1.2 mmol/L 和 2.4 mmol/L 时反应液为橘黄, 其余反应液为绿色。因此, 确定 25  $\mu$ L 体系中  $Mg^{2+}$  的最佳浓度为 3.6 mmol/L。

### 2.3 dNTPs 浓度的确定

由图 3a 可知, 当 dNTPs 浓度为 0.64 mmol/L 时, 产生模糊的阶梯状片段; 当浓度达到 0.8 mmol/L 时, 阶梯状片段较为清晰; 当浓度为 0.96 mmol/L 时, 阶梯状片段最清晰。SYBR Green I 检测结果如图 3b 所示, 阴性对照管反应液为橘黄, 其余反应液为绿色。

因此, 确定 25  $\mu\text{L}$  体系中 dNTPs 的最佳浓度为 0.96 mmol/L。

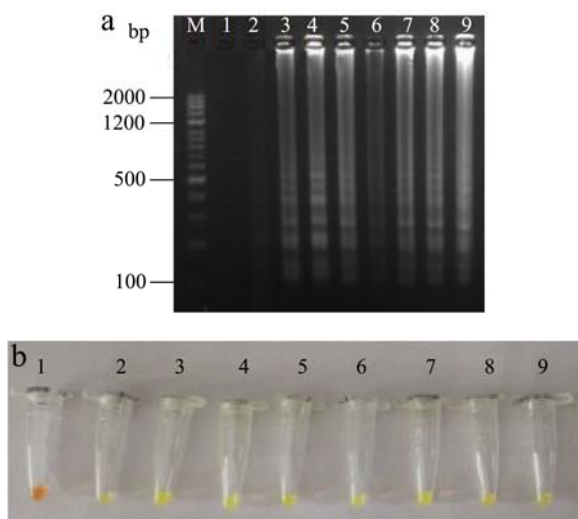


图3 dNTPs 浓度对 LAMP 反应的影响

Fig.3 Effect of dNTP concentrations on LAMP reaction

注: a 表示 dNTPs 浓度对 LAMP 反应影响的电泳检测结果; b 表示 dNTPs 浓度对 LAMP 反应影响的 SYBR Green I 检测结果。M 表示 100 bp marker; 1 表示阴性对照; 2~9 表示 dNTPs 浓度依次为 0.64 mmol/L、0.8 mmol/L、0.96 mmol/L、1.12 mmol/L、1.28 mmol/L、1.44 mmol/L、1.6 mmol/L 和 1.76 mmol/L。

### 2.4 Bst DNA 聚合酶量的确定

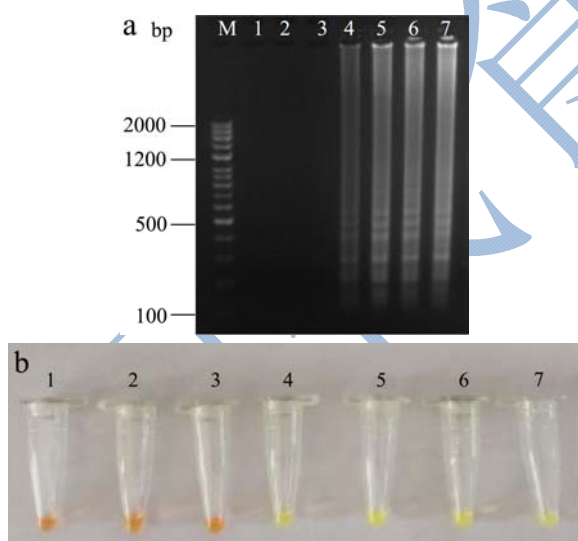


图4 Bst DNA 聚合酶量对 LAMP 反应的影响

Fig.4 Effect of different amounts of DNA Bst polymerase on LAMP reaction

注: a 表示 Bst DNA 聚合酶量对 LAMP 反应影响的电泳检测结果; b 表示 Bst DNA 聚合酶量对 LAMP 反应影响的 SYBR Green I 检测结果。M 表示 100 bp marker; 1 表示阴性对照; 2~7 表示 Bst DNA 聚合酶量依次为 0 U、1.6 U、3.2 U、4.8 U、6.4 U 和 8 U。

Bst DNA 聚合酶量对反应的影响如图 4a 所示, 当酶量为 0 U 和 1.6 U 时, 无产物扩增; 当酶量达到 3.2 U 时, 开始产生较清晰的阶梯状片段; 当酶量为 4.8 U 时, 产生的阶梯状片段最为清晰。SYBR Green I 检测结果如图 4b 所示, 阴性对照管和 Bst DNA 聚合酶量为 0 U 和 1.6 U 时反应液为橘黄, 其余反应液为绿色。因此, 确定 25  $\mu\text{L}$  体系中 Bst DNA 聚合酶 (8 U/ $\mu\text{L}$ ) 最佳的量为 4.8 U。

### 2.5 内外引物浓度比的确定

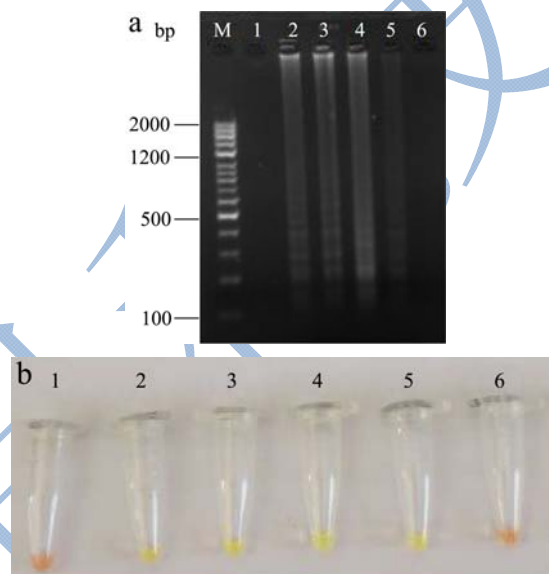


图5 内外引物浓度比对 LAMP 反应的影响

Fig.5 Effect of concentration ratios of inner and outer primers on LAMP reaction

注: a 表示内外引物浓度比对 LAMP 反应影响的电泳检测结果; b 表示内外引物浓度比对 LAMP 反应影响的 SYBR Green I 检测结果。M 表示 100 bp marker; 1 表示阴性对照; 2~6 表示内外引物浓度比依次为 4:1、6:1、8:1、10:1 和 12:1。

引物浓度是影响扩增结果的重要因素, 如图 5a 所示, 内外引物浓度比为 4:1、6:1、8:1 和 10:1 时, 出现阶梯状条带; 当内外引物浓度比为 8:1 时, 电泳条带最为清晰。SYBR Green I 检测结果如图 5b 所示, 阴性对照管和内外引物浓度比为 12:1 时反应液为橘黄, 其余反应液为绿色。因此, 确定 25  $\mu\text{L}$  体系中最佳的内外引物浓度比为 8:1。

### 2.6 反应时间的确定

不同反应时间的结果如图 6a 可知, 当反应时间低于 50 min 时, 无产物扩增; 当反应时间达到 50 min 时, 开始产生清晰的梯状片段; 当反应时间为 60 min 时, 阶梯状片段的亮度和清晰度最佳, 且能保证反应的完全进行。SYBR Green I 检测结果如图 6b 所示,

阴性对照管和反应时间为 20 min、30 min 和 40 min 时反应液为橘黄，其余反应液为绿色。因此，选择 60 min 为最佳反应时间。

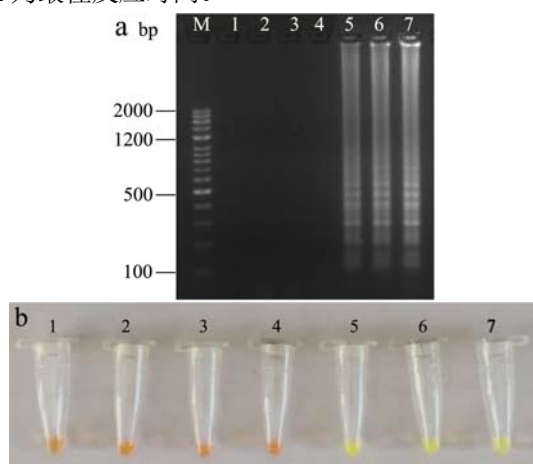


图6 反应时间对 LAMP 反应的影响

Fig.6 Effect of reaction times on LAMP

注：a 表示反应时间对 LAMP 反应影响的电泳检测结果；b 表示反应时间对 LAMP 反应影响的 SYBR Green I 检测结果。M 表示 100 bp marker；1 表示阴性对照；2~7 表示反应时间依次为 20 min、30 min、40 min、50 min、60 min 和 70 min。

### 2.7 反应温度的确定

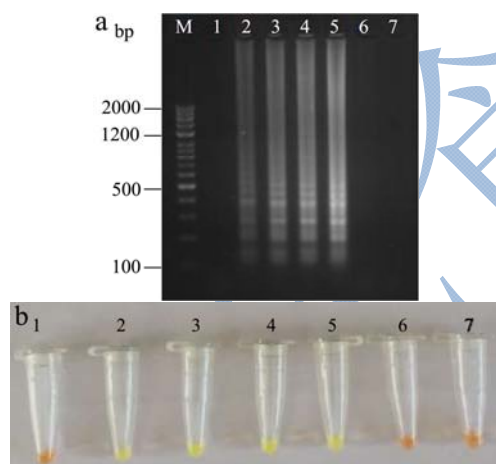


图7 反应温度对 LAMP 反应的影响

Fig.7 Effect of reaction temperatures on LAMP

注：a 表示反应温度对 LAMP 反应影响的电泳检测结果；b 表示反应温度对 LAMP 反应影响的 SYBR Green I 检测结果。M 表示 100 bp marker；1 表示阴性对照；2~7 表示反应温度依次为 57 °C、59 °C、61 °C、63 °C、65 °C 和 67 °C。

由图 7a 可知，当反应温度高于 63 °C 时，无阶梯状片段产生；在 57~63 °C 时有阶梯状条带产生，且在 63 °C 时扩增条带最清晰。SYBR Green I 检测结果如图 7b 所示，阴性对照管和反应温度为 65 °C 和 67 °C 时反应液为橘黄，其余反应液为绿色。因此，选择 63 °C 为最佳的反应温度。

### 2.8 灵敏度实验

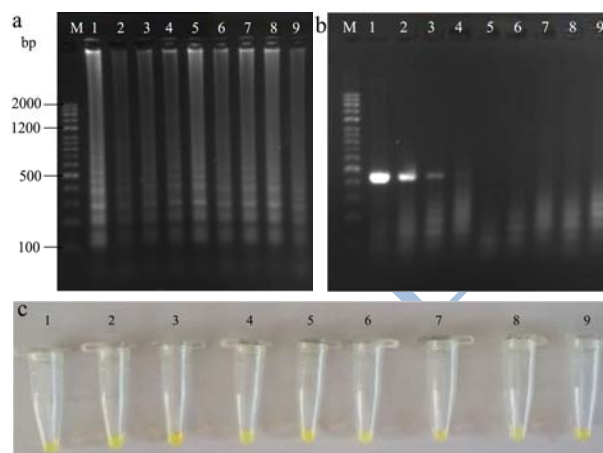


图8 LAMP 检测副溶血性弧菌纯培养物灵敏度

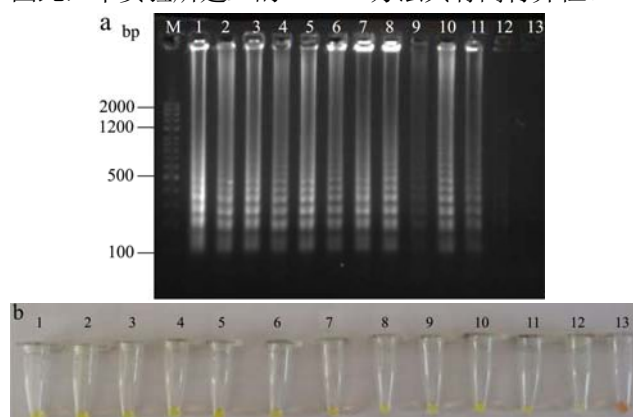
Fig.8 Sensitivities of LAMP and PCR

注：a 表示 LAMP 检测副溶血性弧菌灵敏度的电泳检测结果；b 表示 PCR 检测副溶血性弧菌灵敏度的电泳检测结果；c 表示 LAMP 检测副溶血性弧菌灵敏度的 SYBR Green I 检测结果。M 表示 100 bp marker；1~9 表示菌落数依次为  $1 \times 10^8$  CFU/mL、 $1 \times 10^7$  CFU/mL、 $1 \times 10^6$  CFU/mL、 $1 \times 10^5$  CFU/mL、 $1 \times 10^4$  CFU/mL、 $1 \times 10^3$  CFU/mL、 $1 \times 10^2$  CFU/mL、 $1 \times 10^1$  CFU/mL 和 1 CFU/mL。

由图 8a 和 8b 可知，本实验所建立的 LAMP 方法的最低检测限为 1 CFU/mL，而普通 PCR 方法的最低检测限为  $1 \times 10^5$  CFU/mL，远高于 LAMP 方法。SYBR Green I 检测结果如图 8c 所示，所有反应管的反应液均为绿色。因此，LAMP 方法具有较高的灵敏度。

### 2.9 特异性实验

对 7 种菌株共 32 株进行特异性检测，结果如图 9 所示，副溶血性弧菌标准菌株和 25 株从实验室分离的副溶血性弧菌均有阶梯状条带产生，用 SYBR Green I 检测反应液变为绿色；6 株非副溶血性弧菌和阴性对照无条带产生，用 SYBR Green I 检测反应液为橘黄。因此，本实验所建立的 LAMP 方法具有高特异性。





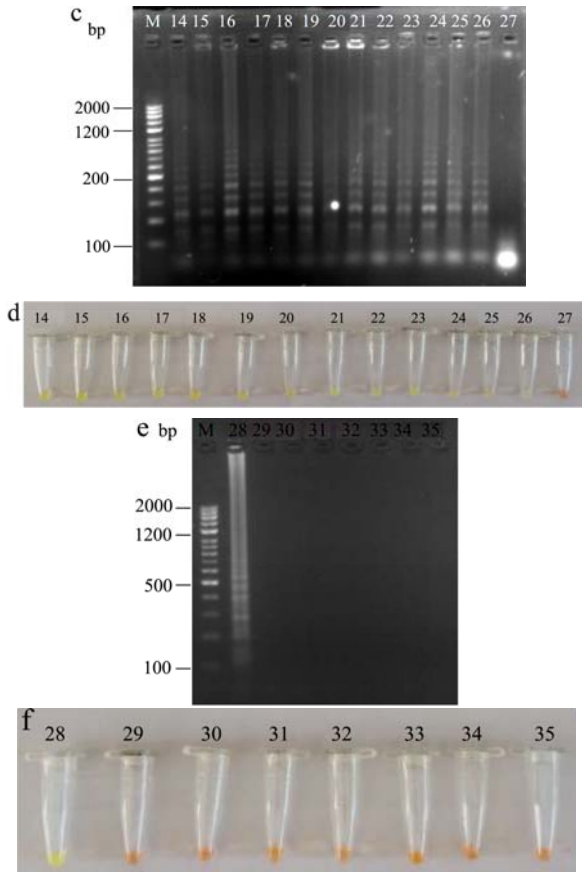


图9 LAMP 特异性实验结果

Fig.9 Results of LAMP specificity tests

注: a、c 和 e 表示 LAMP 特异性实验的电泳检测结果; b、d 和 f 表示 LAMP 特异性实验的 SYBR Green I 检测结果。M 表示 100 bp marker; 1~8 表示副溶血性弧菌 Vp-WG15 1~8; 9~12、14~17 表示副溶血性弧菌 Vp-HG15 1~8; 18~26 表示副溶血性弧菌 Vp-C15 1~9; 28 表示副溶血性弧菌 ATCC17802; 13、27 和 29 表示阴性对照; 30 表示大肠杆菌; 31 表示金黄色葡萄球菌; 32 表示志贺氏菌; 33 表示蜡样芽胞杆菌; 34 表示单核细胞增生李斯特菌; 35 表示沙门氏菌。

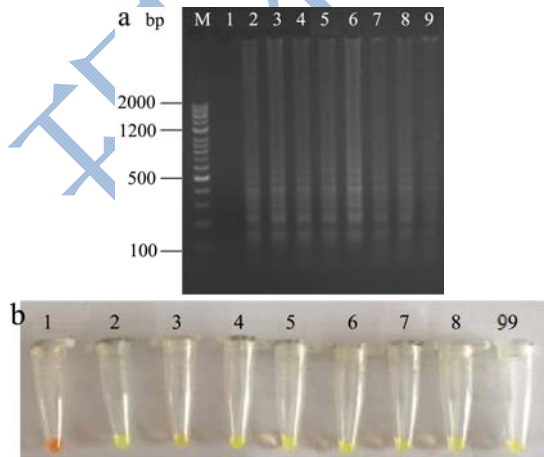


图10 LAMP 检测人工污染样品

Fig.10 LAMP detection of artificially polluted samples

注: a 表示人工污染样品检测的电泳检测结果; b 表示人

工污染样品检测的 SYBR Green I 检测结果。M 表示 100 bp marker; 1 表示阴性对照; 2~5: 菌落数依次为  $1 \times 10^3$  CFU/mL、 $1 \times 10^2$  CFU/mL、 $1 \times 10^1$  CFU/mL 和 1 CFU/mL (用 1.3.2 的方法制备 DNA); 6~9: 菌落数依次为  $1 \times 10^3$  CFU/mL、 $1 \times 10^2$  CFU/mL、 $1 \times 10^1$  CFU/mL 和 1 CFU/mL (用煮沸不离心的方法制备 DNA)。

### 2.10 人工污染样品检测

人工污染样品检测如图 10a 所示, 所有染菌的样品均有阶梯状片段出现, 且用两种不同方法制备 DNA 模板进行检测的检测限均达到 1 CFU/mL。SYBR Green I 检测结果如图 10b 所示, 阴性对照管反应液为橘黄, 其余反应液为绿色。

## 3 讨论

我国东南沿海是副溶血性弧菌食物中毒的高发地区, 传统的国标检测法和常规 PCR 技术皆存在局限性, 无法满足高通量现场检测的实际需求。随着分子生物学技术的不断发展和应用创新, LAMP 方法不仅被用于病原微生物检测、胚胎的性别鉴定和肿瘤检测, 且已成功应用于食品安全检测领域<sup>[12]</sup>。2000 年, 日本学者 Notomi 等<sup>[13]</sup>发明了 LAMP 技术。该方法针对靶基因 6 个位点设计 4 条特异性引物, 在高活性的链置换 DNA 聚合酶作用下, 恒温条件 ( $60 \sim 65^\circ\text{C}$ ) 下保温 60 min 左右, 即可完成对核酸的扩增。该技术 1 h 内可特异性地扩增 DNA 到  $10^9 \sim 10^{10}$  个拷贝, 且其特异性高、敏感性好、操作简单, 在分子检测方面具有广阔的发展前景。副溶血性弧菌的不耐热溶血毒素 (*tlh*) 最早被 Taniguchi 等<sup>[14]</sup>发现, *tlh* 基因总长度为 1257 bp, 编码大小约 45000 的细胞外分泌性磷脂酶, 在卵磷脂存在的条件下可溶解人和马属动物的红细胞, 关于该基因与副溶血性弧菌致病作用的关系目前还没有明确的结论, 学者们主要将其作为种属特异性的靶点用于快速检测副溶血性弧菌。

LAMP 反应受多个因素影响, 其中  $\text{Mg}^{2+}$  浓度、Bst DNA 聚合酶量、内外引物浓度比和 dNTPs 浓度最为关键。本研究以副溶血性弧菌 *tlh* 基因为靶基因在线设计并合成 4 条特异性引物, 并对反应体系中  $\text{Mg}^{2+}$  和 dNTPs 的浓度、Bst DNA 聚合酶的量、内外引物浓度比、反应时间和温度进行系统的优化, 确定最适的  $\text{Mg}^{2+}$  浓度为 3.6 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.96 mmol/L, Bst DNA 聚合酶的添加量为 4.8 U, 内外引物浓度比为 8:1, 最佳反应温度为  $63^\circ\text{C}$ , 反应时间为 60 min, 从而建立一种快速检测副溶血弧菌的 LAMP 方法。本方法对细菌纯培养物的最低检测限为 1 CFU/mL 低于普

通 PCR 的最低检测  $1 \times 10^5$  CFU/mL, 同时也低于已报道的多重 PCR 和荧光定量 PCR<sup>[15]</sup>方法。对虾样品进行人工污染, 采用两种方法制备 DNA 进行 LAMP 反应, 结果显示检测限均达到 1 CFU/mL, 表明本方法可完全摆脱离心机的使用, 适合现场检测。采用建立的 LAMP 方法对 25 株从文蛤、花蛤和蛭中分离的副溶血性弧菌和 6 株非副溶血性弧菌进行检测。结果显示, 除 6 株非副溶血性弧菌外, 其余菌株均为阳性, 因此该方法的特异性较强。本实验无需特殊的仪器设备, 只需水浴锅即可完成检测; 反应时间短, 50 min 可检测到反应产物, 且扩增结果可通过加入 SYBR Green I 染色, 观察反应液颜色变化判断。

#### 4 结论

本试验建立的基于副溶血性弧菌 *tlh* 基因的 LAMP 方法, 各参数最佳条件为:  $Mg^{2+}$  浓度为 3.6 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.96 mmol/L, Bst DNA 聚合酶用量为 4.8 U, 内外引物浓度比为 8:1, 最佳反应温度为 63 °C, 时间为 60 min。LAMP 的检测限为 1 CFU/mL。所建立的 LAMP 是一种操作简单、快速、特异性强及灵敏度高的检测技术, 为食品中副溶血弧菌的检测提供了新的方向。

#### 参考文献

- [1] Wang R, Sun L, Wang Y, et al. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in different food matrices [J]. Journal of Food Protection, 2016, 79(2): 288-293
- [2] Ueno H, Tomari K, Kikuchi K, et al. The first report of *Vibrio parahaemolyticus* strain O10: K60 in Japan, a new combination of O and K serotypes isolated from a patient with gastroenteritis [J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2016, 69(1): 28-32
- [3] Su Y C, Liu C. *Vibrio Parahemolyticus*: A concern of seafood safety [J]. Food Microbiology, 2007, 24(6): 549-558
- [4] 刘雪飞, 申越, 任园园, 等. 海产品中副溶血性弧菌检测方法研究进展 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 370-378  
LIU Xue-fei, SHEN Yue, REN Yuan-yuan, et al. Research progress in detection method of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(5): 370-378
- [5] Ward N, Bei A K. Detection of *Vibrio Parahemolyticus* in shellfish by use of multiplexed real-time PCR with TaqMan fluorescent probes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(3): 2031-2042
- [6] 龚勇, 胡佩红. ELISA 法快速检测水产品中副溶血性弧菌 [J]. 现代食品科技, 2008, 24(6): 598-602
- [7] DOU Yong, HU Pei-hong. Application of indirect ELISA method for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(6): 598-602
- [8] Wang R, Zhong Y, Gu X, et al. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6(32): 144
- [9] 徐芊, 孙晓红, 赵勇, 等. 副溶血弧菌 LAMP 检测方法的建立 [J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(12): 66-72  
XU Qian, SUN Xiao-hong, ZHAO Yong, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. China Biotechnology, 2007, 27(12): 66-72
- [10] 纪懿芳, 胡文忠, 姜爱丽, 等. LAMP 技术快速检测海产品副溶血弧菌的条件优化 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(20): 59-63  
JI Yi-fang, HU Wen-zhong, JIANG Ai-li, et al. Optimize of loop-mediated isothermal amplification technology in detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(20): 59-63
- [11] 秦国民, 白雪松, 毕可然, 等. 基于 *tlh* 基因病原副溶血弧菌 LAMP 检测方法的建立 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014, 5: 39-42  
QIN Guo-min, BAI Xue-song, BI Ke-ran, et al. Construction of the loop-mediated isothermal amplification method for detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* based on the *tlh* gene [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2014, 5: 39-42
- [12] 刘琦, 周德庆, 柳淑芳, 等. PCR 快速检测水产品中副溶血性弧菌的方法研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(11): 490-493  
LIU Qi, ZHOU De-qing, LIU Shu-fang, et al. Study on PCR method for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products [J]. Food Science, 2008, 29(11): 490-493
- [13] Wang Y, Li D, Wang Y, et al. Rapid and sensitive detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* by multiple endonuclease restriction real-time loop-mediated isothermal amplification technique [J]. 2016, 21(1): 428-431
- [14] Notomoi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63
- [15] Taniguchi H, Hirano H, Kubomura S, et al. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microbial Pathogenesis, 1986, 1(5): 425-432
- [16] 覃倚莹, 吴晖, 肖性龙, 等. *toxR* 基因作为荧光定量 PCR 靶基因设计 TaqMan 探针快速检测副溶血弧菌 [J]. 中国生物工



程学报, 2008,24(10):1837-1842

real-time PCR assay targeting the *toxR* gene [J]. Chinese

QIN Yi-ying, WU Hui, XIAO Xing-long, et al. Rapid  
detection of *Vibrio parahaemolyticus* by TaqMan-based

Journal of Biotechnology, 2008, 24(10): 1837-1842

现代食品科技